

201231025A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患克服研究事業)

副腎ホルモン産生異常に関する調査研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 柳 瀬 敏 彦

平成 25 年 3 月

目次

I. 序文	1
II. 研究班構成員名簿	5
III. 総括研究報告書	9
研究代表者 福岡大学医学部 内分泌・糖尿病内科学	
	柳瀬 敏彦
IV. 分担研究報告書	19
(1) 疫学関連研究	21
1. 全国疫学調査二次調査解析	23
福岡大学医学部衛生・公衆衛生学	
	三宅 吉博
2. 副腎偶発腫長期予後調査	39
東邦大学医学部内科学糖尿病・代謝・内分泌分野	
	上芝 元
3. 副腎性サブクリニカルクッシング症候群患者の長期予後調査	42
九州大学大学院医学研究院病態制御内科学	
	高柳 涼一
4. 副腎ホルモン産生異常症の全国疫学調査における、21水酸化酵素欠損症以外の 先天性副腎過形成、先天性副腎低形成、偽性低アルドステロン症についての解析	48
旭川医科大学小児科	
	棚橋 祐典
(2) 先天性副腎酵素異常症の生化学的・遺伝子学的診断システムの確立	55
5. 本邦におけるCYP11B2遺伝子異常によるアルドステロン単独欠損症について	57
北海道大学大学院医学研究科	
	田島 敏広

6. 自然に思春期が発来したコレステロール側鎖切断酵素欠損症の女児で見いだされた 変異CYP11A1遺伝子の機能解析	59
国立成育医療研究センター 分子内分泌研究部 基礎内分泌研究室	
	勝又 規行
7. 尿ステロイドプロファイルによる非古典型を含む21-水酸化酵素欠損症および P450オキシドレダクターゼ欠損症の新生児・乳児期鑑別診断	64
慶應義塾大学医学部小児科学	
	長谷川 奉延
(3) 副腎発生・分化・再生機構の基礎研究	69
8. ヒトiPS/ES細胞からのステロイド産生細胞の分化誘導	71
京都大学大学院医学研究科 内分泌代謝内科	
	曾根 正勝
9. 副腎皮質の発生初期過程に関する研究	75
九州大学大学院医学研究院	
	諸橋憲一郎
10. ステロイドホルモン合成関連遺伝子群の新たな転写調節	79
福井大学医学部分子生体情報学	
	宮本 薫
(4) PA診断基準の再評価	85
11. 原発性アルドステロン症 (PA) の機能確認検査と病型診断	87
国立病院機構京都医療センター内分泌代謝高血圧研究部	
	成瀬 光栄
12. 「両側アルドステロン産生副腎皮質腺腫による原発性アルドステロン症の診断と治療」 に関する研究	92
東北大学病院 腎・高血圧・内分泌科	
	佐藤 文俊

13. KCNJ5遺伝子変異の有無による原発性アルドステロン症 (PA) 臨床的特徴の比較 …94
 横浜労災病院
 西川 哲男
14. 本邦アルドステロン産生腺腫におけるKCNJ5遺伝子変異の特徴 ……………98
 群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科
 山田 正信
15. 特発性アルドステロン症患者における血清中アルドステロン分泌促進因子の検討 …102
 慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科
 柴田 洋孝
16. 高血圧合併2型糖尿病における原発性アルドステロン症の合併頻度と
 臨床的特徴の検討 ……………107
 福岡大学医学部内分泌・糖尿病内科
 柳瀬 敏彦
17. 原発性アルドステロン症患者におけるミネラルコルチコイド受容体拮抗薬による
 寛解効果 ……………113
 金沢大学医薬保健研究域医学系臓器機能制御学 (内分泌代謝内科)
 武田 仁勇
18. 原発性アルドステロン症に対するミネラルコルチコイド拮抗薬の有用性に関する
 研究 ……………116
 聖マリアンナ医科大学 横浜市西部病院 代謝・内分泌内科
 方波見卓行
- (5) GC抵抗症や偽性低アルドステロン症の病態理解と治療法開発のための
 GC/アルドステロン作用機構の基礎的研究 ……………119
19. 骨格筋量・筋力制御におけるグルココルチコイドとそのレセプターの意義に関する
 研究 ……………121
 東京大学医科学研究所附属病院アレルギー免疫科
 田中 廣壽

(6) 副腎腫瘍の成因や発生機序に関する基礎的研究の推進	127
20. ヒト副腎皮質および皮質腫瘍におけるEstrogen-related receptor α (ERR α) 発現の検討	129
東北大学大学院医学系研究科医科学専攻病理病態学講座病理診断学分野 笹野 公伸	
21. アンジオテンシンII依存性アルドステロン合成における転写因子NFATの関与 ーヒト副腎細胞株 NCI-H295Rを用いた検討ー	133
高知大学保健管理センター 岩崎 泰正	
V. 会議記録	141
VI. 研究成果の刊行に関する一覧表	163

I. 序 文

序 文

本研究班は副腎ホルモン産生・作用異常症の実態把握と病因・病態の解明に努め、適切な診断・治療法を国民に提示することを目的としています。平成23年度より、衣替えをして新班としてスタートし、平成24年度が2年目にあたります。発足当初より、我が国で欠落している疾患予後調査を当班研究の柱に据え、疫学、基礎・臨床の観点から研究を行っています。

H22年時の全国疫学調査で二次調査の回収率が30%にとどまった3疾患に関して1年間の延長追加調査を行い、最終的に原発性アルドステロン症（PA）1706例、サブクリニカルクッシング症候群（SCS）390名、アジソン病146名のデータ収集を終了し、疫学専門の三宅氏（分担研究者）による統計解析が本年度成果としてまとめられておりますので、ご参照いただければ幸いです。調査期間が2003－2007年という限定はありますが、特記すべき点としては、原発性アルドステロン症における高血圧、低K血症の改善予後に関しては多変量解析の結果、薬物療法に比べ、手術療法の統計学的優位性が明らかとなっております。またサブクリニカルクッシング症候群において、副腎腫瘍径3.5cm以上が高血圧の予後不良因子となることが判明しています。これらの疫学データは、当該分野では、我が国最大規模の疫学データであり、今後の診療・治療指針作成上、重要な参考資料になると考えられます。

また、平成25年度は、過去に全国調査をした副腎偶発種の10年後予後調査により、今まで未解明の様々な副腎腫瘍の予後を明らかにし、適切な治療ガイドラインの作成に役立てたいと考えておりますので、一層のご理解、ご協力のほどよろしくお願い申し上げます。

また、平成24年度は、下垂体患者会の皆様のご協力を得て、副腎疾患に関する第1回市民公開講座を開催させていただき、患者会の皆様との交流の足場も出来ました。今後も市民並びに一般医家に向けて情報公開を積極的に行いたいと思います。

本研究班の研究目標の達成に向けてご尽力いただいている研究分担者の皆様、また全国疫学研究の重要性を認識していただき疫学調査にご協力いただいた全国の先生方に心から深謝申し上げます。また、種々、ご指導いただきました厚生労働省並びに国立保健医療科学院の関係者の皆様にも深謝いたします。

平成24年3月

「副腎ホルモン産生異常に関する調査研究」班
研究代表者 柳瀬 敏彦

II. 研究班構成員名簿

副腎ホルモン産生異常に関する調査研究班

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研究代表者	柳瀬 敏彦	福岡大学医学部内分泌・糖尿病内科	教 授
研究分担者	諸橋憲一郎	九州大学大学院医学研究院分子生命科学性差生物学	主幹教授
	宮本 薫	福井大学医学部分子生体情報学	教 授
	田中 廣壽	東京大学医科学研究所先端医療研究センター免疫病態分野	教 授
	高柳 涼一	九州大学大学院医学研究院病態制御内科	教 授
	成瀬 光栄	独立行政法人国立病院機構京都医療センター 臨床研究センター内分泌代謝高血圧研究部	部 長
	長谷川奉延	慶應義塾大学医学部小児科学	教 授
	田島 敏広	北海道大学大学院医学研究科小児科	講 師
	勝又 規行	独立行政法人国立成育医療研究センター研究所 分子内分泌研究部基礎内分泌研究室	室 長
	棚橋 祐典	旭川医科大学小児科学	助 教
	西川 哲男	独立行政法人労働者健康福祉機構横浜労災病院 内分泌糖尿病センター	院 長
	柴田 洋孝	慶應義塾大学医学部腎臓・内分泌・代謝内科	専任講師
	武田 仁勇	金沢大学医薬保健研究域医学系臓器機能制御学	准 教授
	曾根 正勝	京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科	特定講師
	佐藤 文俊	東北大学病院腎・高血圧・内分泌科	講 師
	岩崎 泰正	高知大学保健管理センター	教 授
	笹野 公伸	東北大学大学院医学系研究科病理診断学分野	教 授
	上芝 元	東邦大学医学部内科学糖尿病代謝内分泌科	准 教授
	山田 正信	群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科	准 教授
方波見卓行	聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院代謝・内分泌科	准教授・部長	
三宅 吉博	福岡大学医学部衛生・公衆衛生学	准 教授	
事 務 局		〒814-0180 福岡市城南区七隈 7-45-1 福岡大学医学部内分泌・糖尿病内科（三小田玲子） T E L 092-801-1011（内 3645） F A X 092-865-5163	
経理事務担当者		〒814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1 福岡大学研究推進部研究推進課（三村正彦） T E L 092-871-6631（内 2824） F A X 092-866-2308	

Ⅲ. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
総括研究報告書

副腎ホルモン産生異常に関する調査研究

研究代表者 柳瀬 敏彦

福岡大学医学部 内分泌・糖尿病内科

研究要旨

本研究班では、疫学関連研究、先天性副腎酵素異常症における病態・診断・治療に関する研究、副腎発生・分化・再生関連研究、原発性アルドステロン症(PA)関連研究、副腎ステロイド作用機構に関する研究、副腎腫瘍の成因や発生機序に関する研究等を行い、以下のような成果が報告された。(1) 疫学関連研究：H22年時の全国疫学調査で二次調査の回収率が30%にとどまった3疾患に関して1年間の延長追加解析を行い、最終的にPA1706例、サブクリニカルクッシング症候群(SCS)390名、アジソン病146名のデータ収集を終了し、疫学専門の三宅氏（分担研究者）による統計解析が行われた。2003-2007年における実態と期間内での興味深い治療予後が明らかとなった。特記すべき2点として、PAにおける高血圧、低K血症の改善予後に関して多変量解析の結果、薬物療法に較べ、手術療法の統計学的優位性が明らかとなった。またSCSにおいて、副腎腫瘍径3.5cm以上が高血圧の予後不良因子となることが判明した（三宅、柳瀬ほか）。以前、当研究班で調査した副腎偶発腫の10年後予後調査を平成25年度に計画しており、そのための調査票の内容を班会議等で討議し作成した（上芝、柳瀬）。施設研究として副腎性SCS38症例の長期観察において、生活習慣病の悪化に関連する因子の解析の結果、男性症例、両側副腎腫瘍において、高血圧、糖尿病の悪化傾向を認めた（高柳）。全国疫学調査に基づき、21-水酸化酵素欠損症(21OHD)以外の先天性副腎過形成、先天性副腎低形成、偽性低アルドステロン実態報告がなされた。特に57例の先天性副腎低形成の内訳において、DAX-1、SF-1、MC2Rなどの既知遺伝子変異のほか、遺伝子変異なしも16例報告され、本症にはなお病因不明の病態が存在することが明らかとなった（棚橋）。(2)先天性副腎酵素異常症の生化学的・遺伝子学的診断システムの確立：本班では難病、稀少疾患である先天性の副腎ステロイド産生異常症の病態、診断法、成因解明に努めている。本邦で初めて日本人小児2例のアルドステロン欠損症におけるCYP11B2変異が明らかとなった（田島）。コレステロール側鎖切断酵素（SCC）欠損症の女児のCYP11A1遺伝子異常と臨床像を解析し、本症においても思春期が自然発来することが明確となった（勝又）。古典型21-水酸化酵素欠損症（C21OHD）とP450オキシドレクターゼ欠損症（PORD）の鑑別診断指標が非古典型（NC21OHD）を含む21OHDとPORDの新生児・乳児期鑑別診断においても有用であることが確認された（長谷川）。現在、我が国では上記の稀少難病疾患の遺伝子検査等は一般病院では困難であり、確定診断に至らない症例も多いと思われる。当班の成果を踏まえ、本研究班班員の連携による先天性副産生異常症の生化学的・遺伝子学的診断システム（検査可能機関等）のHP上での情報公開による均一な医療サービスの提供に向けて準備を進めている（勝又、田島、長谷川、棚橋）。

(3)副腎発生・分化・再生機構の基礎研究：再生医療研究では、iPS細胞からのステロイドホルモン産生細胞の創生に成功した（曾根）。また副腎皮質におけるSF-1の標的遺伝子の探索研究から一群の解糖系酵素遺伝子がSF-1の制御を受けていることが明らかとなり、解糖系酵素群の発現がステロイド産生細胞増殖に関わっている可能性が提示された（諸橋）。また幹細胞からステロイド産生細胞への分化誘導系を用いて、新たなSF-1標的遺伝子の同定を試みた。ゲノムワイドのChIP-on-chip assayおよびマイクロアレイによる網羅的発現解析により、新たなSF-1標的遺伝子としてglutathione S-transferase(GST)family (GSTA1-4)のうち、GSTA1 とGSTA3が 3β -HSD同様、3-keto- Δ 5-steroidから3-keto- Δ 4-steroidへのイソメラーゼ活性を有していることが明らかになった（宮本）。

(4) PA関連研究：本班では日本内分泌学会と合同で作成したPA診療ガイドラインの普及、啓蒙に努力すると同時に、PA診断、病型鑑別（腺腫、両側副腎過形成）に関して可能な限り、簡易化、標準化を目指す研究努力を続けている。病型鑑別のためにACTH負荷試験、生食負荷試験における新たなカットオフ値の提示がなされた（成瀬）。腫瘍性病変に由来する原発性アルドステロン症は、片側腺腫（APA）、片側微小腺腫（mAPA）が主たる病型であるが両側腺腫も時に経験される。両側性病変では、両側副腎過形成(IHA)との鑑別が临床上重要であり、これにより治療選択が異なる。超選択的AVSの施行により両側APAを正常副腎温存両側副腎手術により治癒させることは可能であることを示した（佐藤）。また、最近のトピックであるPA腺腫のKCNJ5遺伝子変異とその臨床型との関連も本班研究で次第に明らかにされつつある。多数例のAPAの解析の結果、70%と高率にKCNJ5変異を同定し、変異群ではACTHに対する反応性が非変異群に比して過大であるとの特徴を明らかにした（西川）。さらに同変異を伴うAPAでは非変異例に比して、アルドステロン産生能が強く、より重症型であることを示した（山田）。IHA患者の血清中にはPKAあるいはAII非依存性のアルドステロン分泌促進因子が存在する可能性を示唆した（柴田）。日常臨床で、糖尿病に高血圧は50-60%の頻度で合併するが、糖尿病におけるPA合併頻度は我が国では明らかでなかった。糖尿病合併高血圧患者124例におけるPA頻度を検討したところ、14例(11.3%)と高率にPAの合併を認め、PA合併糖尿病例では高血圧が糖尿病より先行する症例が多いことを明らかにした（柳瀬）。PAが手術をせずに薬剤治療で臨床的寛解状態に至ることが可能かどうかは、臨床的に重要な課題である。スピロラクトン長期使用例では臨床的寛解を示すPA群があることが呈示された（武田）。PAの臨床的活動性指標としてAldosterone Resolution Score (ARS)を用い、PAに対する抗アルドステロン薬の効果を検討したところ、ARS3点程度の例では抗アルドステロン薬主体の降圧療法は、手術と同等の改善効果が期待できることを示した（方波見）。

(5) GC抵抗症や偽性低アルドステロン症の病態理解と治療法開発のための副腎ステロイド作用機構に関する研究：ステロイド作用機構の研究に端を発し、糖質コルチコイド（GC）誘発性筋萎縮の詳細な機序解明が進んでいる。内因性GCは、骨格筋の異化亢進のみならず筋再生にも必須であることが明らかとなった。現在、クッシング症候群などのステロイド誘発性筋萎縮に対する治療をめざした自主臨床研究へと展開している（田中）。

(6) 副腎腫瘍の成因や発生機序に関する研究：ミトコンドリアエネルギー制御に関与するestrogen-related receptor α (ERR α)は思春期後成人副腎、胎児期副腎永久層、副腎腫瘍では副腎皮質癌における相対的高発現を認め、副腎細胞増殖との関連を示した（笹野）。副腎皮質におけるCYP11B2転写調節機序の研究からアンジオテンシンII(AII)やKは少なくとも

も一部Ca²⁺/NFATシグナル伝達系を介してアルドステロン合成を調節している可能性を示唆した(岩崎)。

副腎班ではこれまで患者会が存在しなかったが、下垂体患者会の協力を得て、平成24年12月1日(土)、東京にて本研究班主催の第1回市民公開講座(テーマ:クッシング症候群、副腎皮質機能低下症)を開催し、30人の患者並びに家族の参加を得、熱心な質疑応答が行われた。今後の患者団体との交流の足場が形成された。

分担研究者

諸橋憲一郎	九州大学大学院医学研究院分子生命科学教授
宮本 薫	福井大学医学部分子生体情報教授
高柳 涼一	九州大学大学院医学研究院病態制御内科教授
西川 哲男	横浜労災病院院長
成瀬 光栄	国立京都医療センター臨床研究センター部長
笹野 公伸	東北大学大学院医学系研究科病理診断学教授
岩崎 泰正	高知大学保健管理センター教授
田中 廣壽	東京大学医科学研究所先端医療研究センター准教授
武田 仁勇	金沢大学大学院医学系研究科分子病態内科准教授
長谷川奉延	慶應義塾大学医学部小児科教授
上芝 元	東邦大学医学部内科学糖尿病代謝内分泌科准教授
山田 正信	群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科学准教授
方波見卓行	聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院代謝・内分泌科准教授
勝又 規行	国立成育医療研究センター研究所室長
田島 敏広	北海道大学大学院小児科講師
佐藤 文俊	東北大学病院腎高血圧内分泌科講師
柴田 洋孝	慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科講師
棚橋 祐典	旭川医科大学・小児科助教
曾根 正勝	京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科助教
三宅 吉博	福岡大学医学部衛生・公衆衛生学准教授

A. 研究目的

本班は、副腎ホルモン産生・作用異常症の実態を把握し、病因・病態の解明に努め、より適切な診断・治療法を国民に提示することを目的とする。以下の研究を3カ年計画で実施することを目標としている。

- I. 疫学研究:平成20-22年度全国疫学調査のサブ解析、予後調査研究
- II. 基礎・臨床研究の推進と新たな診断・治療法の開発
 - (1) 先天性副腎酵素異常症の生化学的・遺伝子学的診断システムの確立
 - (2) 副腎低形成症の基盤研究としての副腎発生・分化機構の基礎研究の推進

Ⅲ. 統括研究報告書

- (3) ステロイド産生細胞再生研究とその臨床応用を目指した治療法の開発
- (4) PA診断基準の再評価並びに手術と薬物療法に関する優劣性評価と治療指針策定
- (5) 副腎不全症におけるEBMに基づく至適ステロイド補充療法の提示（指針作成）
- (6) GC抵抗症や偽性低アルドステロン症の病態理解と治療法開発：
副腎ステロイド作用機構、GC副作用発現機序の研究とその臨床応用
- (7) PAや副腎癌など副腎腫瘍の成因や発生機序に関する基礎的研究の推進
- (8) SCSの診断基準の見直し、改訂診断基準の提示

これらの設定目標のうち、平成24年度に実施された研究内容について以下に記載する。

B 研究方法、C研究成果及びD考察

(1) 疫学関連研究

H22年解析時の全国疫学調査で二次調査（調査対象年：2003-2007年）の回収率が低かった疾患に関して1年間の延長追加解析を行い、最終的に原発性アルドステロン症（PA）1706例、副腎性サブクリニカルクッシング症候群（SCS）390名、アジソン病146名のデータ収集を終了し、再解析が行われた。原発性アルドステロン症（PA）では片側性アルドステロン産生腺腫（APA）が最も多く、次いで特発性アルドステロン症（IHA）が多かった。APAでは、手術施行と高血圧及び低カリウム血症の予後改善との間に統計学的に有意な関連を認めたと、薬物療法とは関連がなかった。IHAにおいては、手術施行と低カリウム血症の予後改善との間に有意な関連を認めた。SCSの男女比は3対7、平均発症年齢は55歳であった。SCSの腫瘍最大径3.5cm以上では統計学的に有意に高血圧予後不良と関連を認めた。Addison病の男女比は6対4で、平均発症年齢は51歳であった。Addison病の56%は特発性（自己免疫）、31%が感染性で感染性の85%は結核によるものであった（三宅、柳瀬ほか）。平成25年度の研究計画として、平成11年度から5年間、本班で全国調査として集計した3687例の副腎偶発腫の10年後予後調査の立案計画を行った。班会議等での討議を通じて、調査内容として腫瘍サイズの変化、腫瘍形状の変化、経過中の手術の有無、手術例での最終病理診断、メタボリックシンドロームの合併の有無、高血圧症の状態、高LDL-コレステロール血症の状態、耐糖能異常の状態、合併症（心血管病、脳血管障害、悪性腫瘍）の有無などが調査項目として決定され、調査票を作成した（上芝、柳瀬）。一方、施設研究として副腎性SCS38症例（平均年齢61.4歳）の長期観察において、生活習慣病の悪化に関連する因子の解析の結果、男性症例、両側副腎腫瘍（副腎シンチで両側に集積）において、高血圧、糖尿病の悪化傾向を認めた。両側副腎腫瘍を認め、副腎皮質シンチで両側に集積を認めるSCS症例は、生活習慣病の増悪に加えて、他臓器の悪性腫瘍を高頻度に合併しているため、全身検索と積極的な治療介入が必要と考えられた（高柳）。SCS両側腫瘍性病変はACTH非依存性大結節性副腎過形成（AIMAH）が疑われ、本疾患における悪性腫瘍の合併頻度の検討は、今後の重要な課題と言える。全国疫学調査の二次調査のサブ解析として、21OHD以外の先天性副腎過形成、先天性副腎低形成（AHC）、偽性低アルドステロン症（PHA）の臨床像を解析した。リポイド過形成29例の成因であるStAR異常症は17例で、過去、我が国の実態報告がなかったPOR異常症は17例（社会的男性4例、女性13例）と判明した。AHCに

においてDAX1変異ありは22症例、DAX1変異なしは9例、ACTH不応症が15例で、AHCにはなお病因不明の症例群が存在した。PHAは8例の報告があり全例1型であった。体重増加不良が最も高率であり、治療は1歳で終了し軽快していた。これらの疾患の臨床像の特異性のみならず遺伝学的、臨床的多様性も明らかとなった（棚橋）。

(2) 先天性副腎酵素異常症の生化学的・遺伝子学的診断システムの確立

アルドステロン合成酵素欠損症は新生児期に哺乳不良、低ナトリウム血症、高カリウム血症を呈する疾患であるが、日本人にける遺伝子異常症の報告は過去、認めなかった。今回、アルドステロン合成酵素欠損症の2例においてアルドステロン合成酵素をコードするCYP11B2遺伝子にそれぞれ、W45X, p.R384Xの二つの終止コドンへの変異、またもう一例で、P108L, R181W変異をはじめて同定した（田島）。思春期・二次性徴が自然発来したコレステロール側鎖切断酵素（SCC）欠損症の女兒に以下のCYP11A1変異を見出した。A189Vはスプライシング異常をきたし、SCC酵素活性を16%に低下させ、もう一方のアレルで見いだされたR353W変異は3-8%に低下させた。SCC欠損症でも残存活性により二次性徴を発現させ得ることがはじめて明らかとなった（勝又）。古典型21-水酸化酵素欠損症（C21OHD）とP450オキシドレダクターゼ欠損症（PORD）の鑑別診断指標について、非古典型（NC21OHD）を含む21OHDとPORDの新生児・乳児期鑑別診断における診断精度が評価された。その結果、尿PTL/THEsと11OHAnにより、非古典型（NC21OHD）を含む21OHDとPORDを在胎週数、日齢にかかわらず、高い診断精度で鑑別可能であった。尿PTL/THEsと11OHAnにより、在胎週数、日齢にかかわらず、NC21OHDを含む21OHDとPORDを高い診断精度で鑑別可能であることを示した（長谷川）。

(3) 副腎発生・分化・再生機構の基礎研究：

再生医療研究として、ヒトES/iPS細胞を用いて、ステロイド産生細胞の分化誘導を試みた。ヒトiPS/ES由来胚様体からはStAR、3 β -HSD、CYP11A1、CYP17A1などを発現するステロイド産生細胞が得られた。しかしそれらの細胞はCYP21A2は発現しておらずCYP19を発現しており、培養上清中にプロゲステロンとhCGを産生しており、trophoblast様細胞であると考えられた。次に、ヒトiPS/ES細胞からFlk1、PDGFR α 、Osr-1陽性細胞を分化誘導しSF-1遺伝子を導入して分化誘導を行ったところ、3 β HSD、CYP11A1、CYP17A1、CYP21A2、CYP11B1を発現し、培養上清中にプロゲステロン、コルチコステロン、コルチゾールの産生を認める細胞群を得られ、副腎皮質細胞に近いステロイド合成酵素の発現プロファイルを持つ細胞を再生できることが判明した（曾根）。副腎皮質におけるSF-1の標的遺伝子の探索を次世代シーケンサーとクロマチン免疫沈降法を用いて行った結果、一群の解糖系酵素遺伝子がSF-1の制御を受けていることが明らかとなった。組織特異的転写因子がハウスキーピングなプロセスである解糖系を制御することを示した初めての例である。また解糖系酵素群の発現がステロイド産生細胞増殖に関わっている可能性も提示した。副腎癌では、SF-1遺伝子の発現が高いほど予後不良であることが知られており、新しい副腎癌治療の可能性をも提示する（諸橋）。ChIP-on-chip assay及びDNA microarrayにより網羅的にSF-1標的遺伝子を探索した結果、GSTAファミリー遺伝子群を同定した。これらGSTAファミリー遺伝子群はSF-1による染色体構造変化を介して転写調節されていることが明らかとなった。GSTA familyはSF-1によるクロマチン構造の変化を介して転写制御されること、GSTA1とGSTA3

が 3β -HSDと同様、3-keto- Δ 5-steroidから3-keto- Δ 4-steroidへのイソメラーゼ活性を有していることを明らかにした(宮本)。

(4) PA関連研究

本班ではPA診断、病型鑑別(腺腫、両側副腎過形成)に関して可能な限り、簡易化、標準化を目指す研究努力を続けている。PA病型の鑑別診断法の開発を目的として、迅速ACTH試験を実施した60例と生食負荷試験を実施した35例の各々において、副腎静脈サンプリング(AVS)あるいは手術病理所見に基づき一側性群と両側性群に分類し、ACTH負荷あるいは生食負荷に対する反応性を検討した。迅速ACTH試験実施症例は一側性群41例、両側性群19例で、一側性PAの最適cut-offはACTH負荷後peak PAC403pg/ml(感度70.7%、特異度79.0%)であった。生食負荷試験実施症例は一側性群14例、両側性群21例で一側性群の4時間後PACは両側性群と比較して有意に高値であり、一側性PAの最適cut-offはPAC4h>110pg/ml(感度86%、特異度100%)であった。迅速ACTH試験と生食負荷試験はいずれもPAが一側性か両側性かの病型診断にも有用で、AVSの適否の参考になることが示唆された(成瀬)。PA299例中、134例(44.8%)が腫瘍性病変であり副腎手術による治療を行った。腫瘍性病変134例中、100例(74.6%)が片側APA、29例(21.6%)が術前CTにて病変を指摘し得なかったmAPA、5例(3.7%)が両側APAと診断された。両側APA5例のうち4例は1期的両側副腎手術、1例は2期的手術を施行した。5例中3例は術後に全ての降圧薬を中止、正常血圧を維持している。また、全5例において術後の糖質コルチコイド補充療法より離脱している。CTなどによる画像評価に加えて、超選択的副腎静脈サンプリング(SSAVS)による両側腫瘍性病変と過形成の鑑別に基ついて施行する正常副腎温存両側副腎手術により、両側APAの病態は治癒可能であることが示唆された(佐藤)。アルドステロン産生腺腫APA60例の切除標本組織からcDNAを調整しKCNJ5変異の有無と臨床所見、内分泌検査所見、ACTH負荷副腎静脈採血所見を比較検討した。60例中42例(70%)でKCNJ5変異を認めた。変異群は年齢が若く血漿アルドステロン濃度は高値を示し、ACTH刺激後の末梢血および患側副腎静脈血でのアルドステロン高反応を示した。一方、野生型ではレニン-アンギオテンシン系依存性アルドステロン分泌を認めた。APAのKCNJ5遺伝子異常の有無をACTH負荷試験で鑑別出来る可能性が示唆された(西川)。APA32例の腫瘍検体より抽出したRNAからcDNAを作成し、KCNJ5遺伝子変異の有無を検討した。APA、クッシング症候群(5例)、褐色細胞腫(10例)の各腫瘍におけるKCNJ5mRNA発現量をqPCRにて測定した。32例のAPA症例で、21例(65.6%)にKCNJ5遺伝子変異を認め、新たな変異G151R,451G>Cを発見した。変異例では有意にKCNJ5mRNA発現量が高く、免疫組織学的検討でも高発現であった。APA変異例では血清PAC値、拡張期血圧が有意に高値で、血清K値も有意に低値であった。本邦のAPAは、欧米と比較しKCNJ5遺伝子変異を高率に認め、KCNJ5遺伝子変異はAPA特異的である。変異APAではアルドステロン産生能が強くより重症の可能性が示された(山田)。特発性アルドステロン症(IHA)患者血清のアルドステロン合成酵素CYP11B2転写活性および培地中アルドステロン分泌能への影響をH295R細胞を用いて検討した結果、IHA患者血清は、CYP11B2-luciferaseレポーター活性および培地中アルドステロン濃度をコントロールと比べて有意に上昇させた。また、CTから算出した内臓脂肪面積と有意な相関を認めた。以上からIHAの成因として、内臓脂肪由来のCYP11B2活性化因子が関与する可能性が示唆された(柴田)。日常臨

床で、糖尿病に高血圧は50-60%の頻度で合併するが、糖尿病におけるPA合併頻度は我が国では明らかでなかった。糖尿病合併高血圧患者124例におけるPA頻度を検討したところ、14例(11.3%)と高率にPAの合併を認め、PA合併糖尿病例では高血圧が糖尿病より先行する症例が多いことを明らかにした(柳瀬)。PAが手術をせずに薬剤治療で臨床的寛解状態に至ることが可能かどうかは、臨床的に重要な課題である。PA患者92例に対しスピロノラクトン(SP)(n=47)及びエプレレノン(EPL)(n=42)を投与し、完全寛解(CR)及び部分寛解(PR)について検討した。CRの指標は3カ月間SPまたはEPLの服薬休止にて血漿アルドステロン(p-aldo)/PRA(ARR)<200、カプトプリルなどの負荷試験陰性、正カリウム血症、正常血圧とし、PRはARR<200、負荷試験陰性、正カリウム血症、高血圧とした。SP投与群(平均投与期間4.8年)ではCR 5例(11%)、PR 4例(9%)であった。寛解した群と寛解が得られなかった群において年齢、血圧、ARR、p-aldo、PRA、投与量、投与期間において有意の差を認めなかった。EPL投与群(平均投与期間3.1年)ではCRはなし、PR 4例(8%)であった。PRを示した群と示さなかった群で、SP投与群と同様の指標を検討すると、PR群ではARRが有意に高値であった。今回の研究では寛解率の成績は従来の報告よりSP投与群、EPL投与群とも高く、APAにおいても寛解が観察された(武田)。PAに対しミネラルコルチコイド拮抗薬(MRB)を主体とする降圧治療(M群)を施行した場合の治療効果を臨床的活動性指標としてAldosterone Resolution Score(ARS)を用いて検討し、手術治療(O群)を行った片側APAとの比較も行った。M群(43例)とO群(16例)の高血圧罹病期間、血圧、介入前のPAC、PRA、ARRに差はなく、M群の血清Kは有意に低値、eGFRは有意に高値だった。両群の介入後の血圧、投与降圧薬の数、血清KとeGFRに差はなかった。局在不明のPA対しMRBを主体とする治療を平均約47週行い、比較的良好な降圧とeGFRの改善が得られ、その効果は手術と同等だった。ARSが3点程度の例ではAVSを行わず、MRBを主体とした降圧治療を選択しても手術と類似の降圧と腎機能改善が得られる可能性がある(方波見)。

(5) GC抵抗症や偽性低アルドステロン症の病態理解と治療法開発のための副腎ステロイド作用機構に関する研究:

内因性グルココルチコイドが、筋量制御と筋再生に関連する遺伝子の発現に与える影響を明らかにする目的でラットに副腎摘除を行い、骨格筋遺伝子発現をRT-PCRで検討した。副腎摘除ラットでは絶食によっても骨格筋萎縮関連遺伝子の発現は変化しなかった。人工的筋損傷モデルでは、副腎摘除ラットにおいて筋再生関連遺伝子発現が抑制されていた。すなわち、筋異化を促進するグルココルチコイドの作用を制限して筋量維持をはかる際には、筋衛星細胞を介した筋再生を抑制しない工夫も必要と考えられた。内因性GCは、骨格筋の異化亢進のみならず筋再生にも必須である。現在、ステロイド性筋萎縮に対してmTOR活性化剤である分子鎖アミノ酸を投与する自主臨床研究を展開中である(田中)。

(6) 副腎腫瘍の成因や発生機序に関する研究

Estrogen-related receptor α (ERR α)は副腎を含む各臓器に発現し、ミトコンドリア遺伝子の制御に関与しており、様々な癌においてERR α の発現上昇が報告されている。APA11例、コルチゾール産生副腎皮質腺腫(CPA)11例、副腎皮質癌(ACC)8例、病理解剖で切除された正常副腎40例、胎児副腎7例を対象とし、ERR α 蛋白の発現度を免疫組織化学的に検討、また正常副腎皮質13例、

Ⅲ. 統括研究報告書

副腎皮質腫瘍28例の凍結組織からRNA抽出を行い、RT-PCR法にてERR α のmRNA発現について確認を行った。RT-PCR法では、ERR α のmRNA発現が正常副腎皮質および各種副腎皮質腫瘍のいずれにおいても確認された。ERR α 蛋白の発現度は、正常副腎皮質ではpre-adrenarcheに比べpost-adrenarcheおよび成人で、胎児副腎では胎児層(FZ)に比べ永久層(NC)で、また副腎皮質腫瘍では他の副腎皮質腫瘍に比べ副腎皮質癌で、各々有意に高かった。ERR α は正常副腎皮質の発達、および副腎皮質癌の増大等に有用な役割を果たしている可能性が示唆された(笹野)。副腎皮質ではCYP11B1がコルチゾール合成に、CYP11B2がアルドステロン合成に関与する。両遺伝子の構造は極めて類似しているが、発現調節機構は異なり、前者は主としてangiotensin II(AII)/Ca⁺⁺、後者はACTH/cAMPシグナル伝達系の支配下にある。AIIによるCYP11B2遺伝子転写調節機構の解明により、その選択的な阻害による原発性アルドステロン症の治療法開発を目的として、ヒト副腎皮質由来NCI-H295R(H295R)細胞を用いた解析を行った。その結果、同細胞においてAIIはCYP11B2遺伝子転写活性を20倍以上と強力に刺激した。またAII刺激の細胞内メディエーターであるCa⁺⁺に応答する転写因子[AP1(Fos/Jun)、SRF、NFAT]共発現の効果を検討したところ、NFATにおいて約30倍の増強効果を認めた。CYP11B2遺伝子プロモーター上にはNFAT結合配列が存在し、EMSA法でNFATの結合が認められた。またカルシニューリン/NFAT阻害剤であるcyclosporin A存在下でAII依存性CYP11B2遺伝子転写誘導効果は完全に消失した。NFAT阻害剤は、アルドステロン産生過剰を呈する疾患に有用である可能性がある(岩崎)。

E. 結論

副腎ホルモン産生異常に関する調査研究を様々な観点から行ない、多くの成果が得られた。これらの成果は、本領域の疾患の病態の理解、新たな診断法や治療法の開発に有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

分担研究報告並びに刊行成果参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

KCNJ5遺伝子を利用したアルドステロン産生腺腫の検査方法およびアルドステロン産生腺腫治療薬のスクリーニング方法(山田正信)

特願2012-078098 登録日：平成24年3月29日

(出願中)

体外受精におけるヒト成熟卵子マーカー及びその使用(宮本 薫)

国際出願PCT/JP2012/74486

IV. 分担研究報告書

(1) 疫学関連研究